



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

Taenia solium: SUPEROXIDO DISMUTASA
RECOMBINANTE DE Cu/Zn; SU PURIFICACION Y
CARACTERIZACION PARCIAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

JESUS RICARDO PARRA UNDA



MEXICO, D.F.



2004

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

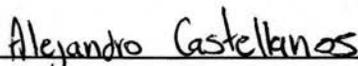
Jurado asignado:

Presidente	Prof. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS
Vocal	Prof. JORGE FERNANDO PANIAGUA SOLÍS
Secretario	Prof. ABRAHAM LANDA PIEDRA
1er. Suplente	Prof. MARIA EVA GONZÁLES TRUJANO
2º. Suplente	Prof. ALBERTO GÓMEZ GUTIÉRREZ

Laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium*. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Edificio A, 2^{do} piso, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, México.



Dr. ABRAHAM LANDA PIEDRA
ASESOR DEL TEMA



Biol. ALEJANDRO CASTELLANOS GONZÁLEZ
SUPERVISOR TÉCNICO



JESÚS RICARDO PARRA UNDA
SUSTENTANTE

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: PARRA UNDA

JESUS RICARDO

FECHA: 28/MAYO/2004

FIRMA: 

DEDICATORIA

A la persona que ha estado conmigo en todo momento, me acompaña desde el primer día de mi vida paso a paso hasta este día.

A la persona que para mí ha sido todo.

A ti mamá.

Por esperar en las noches de desvelo.

Por cuidarme en todo momento.

Por estar ahí en los momentos difíciles.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente al Dr. Abraham Landa Piedra, por todo el apoyo atención y paciencia. Al Biol. Alejandro Castellanos, por su valiosa colaboración por la supervisión y enseñanza de las técnicas en la realización de ésta Tesis.

Agradezco la revisión de esta tesis a los doctores: Eleazar Martínez Barajas, y Jorge Fernando Paniagua Solís, cuyos comentarios y sugerencias ayudaron en la presentación de esta Tesis.

A mis compañeros de la carrera: Sandra, Víctor, Lila, Ricardo, Felipe, Laura... que me acompañaron, aguantaron y compartieron conmigo angustia en exámenes, amistad, y diversión.

A todo el equipo de Las Buenas Peras, que nunca fuimos campeones, pero juntos pasamos momentos inolvidables.

A Adriana por su colaboración en la impresión de éste trabajo.

Y al excelente grupo de investigación del Laboratorio de biología Molecular de *Taenia solium* de la Facultad de Medicina encabezado por el Dr. Abraham Landa y conformado por Alicia, Agustín, Anayetzin Alejandro, Felipe, Gabriela, Gladis, Hugo, José, Isela, Iaraset, Lucía, Marha, Mario, Patricia, Pola y Víctor.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABZ	Albendazol
ADN	Ácido Desoxiribo Nucléico
CAT(s)	Catalasa(s)
DAB	Diaminobencidina
EOx	Estrés Oxidativo
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
GPX(s)	Glutación peroxidasa(s)
IET	Inmunoelctrotransferencia
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactosido
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MBZ	Mebendazol
MTZ	Metronidazol
PBS	Amortiguador Salino de Fosfatos
pH	potencial de iones hidrógeno
PRX(s)	Peroxiredoxinas
PZQ	Prazicuantel
RM	Resonancia Magnética
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SOD(s)	Superóxido Dismutasa(s)
TC	Tomografía computarizada
Tris	Tris (hidroximetil)aminometano
<i>T. solium</i>	<i>Taenia solium</i>
UE	Unidades Enzimáticas

LISTA DE ABREVIATURAS (UNIDADES DE MEDIDA)

cm	Centímetro (s)
°C	Grados centígrados
kDa	Kilodaltones
Kg	Kilogramos
m	Metro (s)
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetro (s)
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
v/v	Volumen en Volumen
μ g	Microgramos
μ L	Microlitros
μ M	Micromolar
μ m	Micrometro

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* del Departamento De Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina; UNAM, bajo la asesoría del Dr. Abraham Landa Piedra.

Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el contrato 35333-M que corresponde al proyecto "Enzimas recombinantes para el diseño de una vacuna contra la cisticercosis por *Taenia solium* "

El alumno Jesús Ricardo Parra Unda (No. de cuenta: 9855277-1) recibió una beca por parte del CONACyT (No. de registro 5697)

CONTENIDO

ÍNDICE

RESUMEN	8
<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	9
<u>1.1 GENERALIDADES DEL PARÁSITO</u>	9
1.1.1 ONCOSFERA;HUEVO	9
1.1.2 LARVA O CISTICERCO	10
1.1.3 ADULTO	10
1.1.4 CICLO BIOLÓGICO	12
<u>1.2. TAENIOSIS Y CISTICERCOSIS</u>	14
1.2.1 TAENIOSIS	14
1.2.2 CISTICERCOSIS	15
1.2.3 EPIDEMIOLOGÍA DE LA CISTICERCOSIS	15
1.2.3.1 CISTICERCOSIS HUMANA	16
<u>1.3 TRATAMIENTO DE LA CISTICERCOSIS</u>	16
1.4.1 ANTIHELMÍNTICOS	17
1.4.2 ANTIEPILÉPTICOS	18
1.4.3 CORTICOSTEROIDES	18
1.4.4 CIRUGÍA	18
<u>1.4 PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA CISTICERCOSIS</u>	18
<u>1.5 DIAGNÓSTICO DE LA TAENIOSIS Y CISTICERCOSIS</u>	19
1.6.1 TAENIOSIS	19
1.6.2 CISTICERCOSIS	20
1.6.2.1 ESTUDIOS DE NEUROIMAGEN	20
1.6.2.2 ANÁLISIS CITOQUÍMICO	20
1.6.2.3 PRUEBAS INMUNOLÓGICAS	20
<u>1.6 ESTRÉS OXIDATIVO</u>	21
<u>1.7 SISTEMAS ANTIOXIDANTES</u>	22
1.8.1 SISTEMAS ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS	23
1.8.2 SISTEMAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS	23
1.8.3 SUPERÓXIDO DISMUTASAS EN HELMINTOS	24

<u>2. HIPÓTESIS</u>	26
<u>3. OBJETIVO GENERAL</u>	26
<u>4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	26
<u>5 .MATERIAL Y MÉTODOS</u>	27
5.1 MATERIAL BIOLÓGICO	27
5.2 TRANSFORMACIÓN E INDUCCIÓN	27
5.3 PURIFICACIÓN	27
5.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS (Metodo de Lowry)	28
5.5 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON SDS (PAGE-SDS)	28
5.6 ENSAYOS DE ACTIVIDAD (Método de Xantina-Xantinaoxidasa)	28
5.7 ENSAYOS DE INHIBICIÓN	29
<u>6. RESULTADOS</u>	30
6.1 PURIFICACIÓN DE LA SUPEROXIDO DISMUTASA DE Cu/Zn DE <i>Taenia solium</i>	30
6.2 CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA	33
6.2.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA	33
6.2.2 IDENTIFICACIÓN DEL COFACTOR METÁLICO	33
6.2.3 ENSAYOS DE INHIBICIÓN CON FÁRMACOS ANTHELMÍNTICOS	34
<u>7. DISCUSIÓN</u>	36
<u>8. CONCLUSIONES</u>	38
<u>9. ANEXO</u>	39
<u>10. REFERENCIAS</u>	41

Taenia solium : SUPERÓXIDO DISMUTASA RECOMBINANTE DE Cu/Zn, SU PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL

RESUMEN

Las superóxido dismutasas son una familia de metaloenzimas que tienen actividad en contra del ión superóxido que se genera durante el estrés oxidativo. En el presente trabajo se purificó y se caracterizó parcialmente una superóxido dismutasa de Cu/Zn recombinante del parásito *Taenia solium* (TsSOD) producida en *Escherichia coli*. La TsSOD fue expresada en el vector de expresión pRSET, para posteriormente ser purificada mediante dos cromatografías de intercambio iónico a diferentes pHs. Por medio de un análisis en gel de poliacrilamida con SDS y de ensayos de actividad específica se observó una proteína pura con un peso molecular relativo de 16 kDa y con una actividad específica de 13333.33 U/mg, así como un rendimiento del 2.5% de la enzima. Por otro lado, se realizaron ensayos con inhibidores específicos (KCN y NaN_3) los cuales indicaron que la SOD producida es de tipo Cu/Zn. También se utilizaron algunos fármacos antihelmínticos como inhibidores (Albendazol, Fenbendazol, Mebendazol, Metronidazol, Praziquantel, Tiabendazol), de los cuales el que presenta el porcentaje de inhibición más alto es el Albendazol con un 41.00%; Esto abre la posibilidad de realizar estudios para diseñar nuevas moléculas para inhibir a la enzima de *T. solium*, sin alterar las moléculas de sus hospederos.

1. INTRODUCCIÓN:

1.1 GENERALIDADES DEL PARÁSITO

Taenia solium

PHYLUM:	<i>Platyhelminthes</i>
CLASE:	<i>Cestoidea</i>
SUBCLASE:	<i>Cestoda</i>
ORDEN:	<i>Cyclophyllidea</i>
FAMILIA:	<i>Taenidae</i>
GENERO:	<i>Taenia</i>
ESPECIE:	<i>solium</i>

Su ciclo de vida comprende tres estadios: huevo, larva, adulto.

1.1.1 ONCOSFERA;HUEVO

Los huevos de *T. solium* y *T. saginata* son indistinguibles unos de otros, tienen forma esférica, de 30 - 40 μm . Los huevos de *T. solium* (figura1) poseen en su interior un embrión hexacanto rodeado por una membrana. La cubierta protectora o embrióforo está formada por bloques constituidos principalmente de queratina y unidos por una proteína cementante. La cubierta se rompe en contacto con ácido clorhídrico, enzimas digestivas, y bilis en el intestino delgado, liberando la oncosfera, la cual puede penetrar la pared intestinal y alcanzar torrente sanguíneo para alojarse en cualquier tejido del hospedero, donde evoluciona a estado larvario en aproximadamente 8 semanas (Carpio A., 2002). El tamaño forma y estructuración de los huevos los hace indistinguibles de los del resto de los ténidos aun observándolos a través del microscopio electrónico de barrido. Generalmente su coloración es blanquecina o ligeramente amarillenta aunque varía de acuerdo con los pigmentos que absorben en el intestino de los hospederos (Willms K & Sotelo J., 2001)

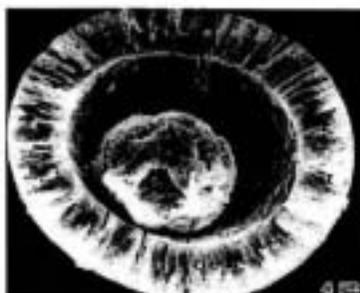


Fig 1. MICROGRAFÍA DE UN HUEVO DE *Taenia solium*
(MICROSCOPIO ELECTRÓNICO)

1.1.2 LARVA O CISTICERCO

La morfología del cisticerco o forma larvaria o metacéstodo, corresponde generalmente a una vesícula de 0.5 a 1.5 cm de diámetro, con un escólex invaginado, el escólex del cisticerco es semejante al del verme adulto y posee un rosetelo armado con una doble corona de ganchos que son en número de 22 a 28 y cuatro ventosas. Se observa como una esfera blanca opaca suspendida dentro de una vesícula llena de líquido (figura 2). La superficie externa es un tejido tegumentario similar al del adulto con microvellosidades protegiendo del contacto directo con el tejido del hospedero. La pared vesicular contiene varios tipos de células dispuestas por la pérdida de tejido conectivo y corpúsculos calcáreos que se mezclan entre ellas; rodeadas por el fluido vesicular, el cual es mayor del 90% del contenido de la larva. El tejido del parásito muerto es reabsorbido lentamente dejando una concreción calcificada en el tejido muscular y cerebral (Barry M, Kaldjian L., 1993)

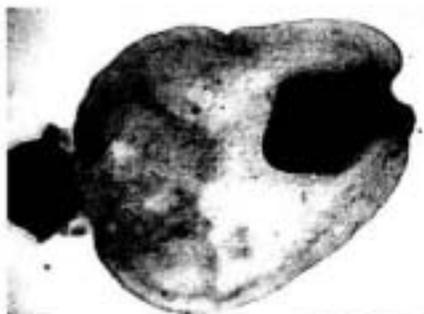


Fig 2. CISTICERCO DE *Taenia solium* MICROSCOPIO ELECTRÓNICO

1.1.3 ADULTO

El adulto de *Taenia solium*, parasita vertebrados, presenta simetría bilateral, es alargado y aplanado dorso ventralmente. El parásito adulto puede dividirse en 3 regiones:

El escólex: órgano de fijación a la mucosa intestinal, redondeado con acetábulos redondos u ovales, además de un rosetelo armado de ganchos de 22 a 32 que miden entre 0.110 y 0.180 mm de largo; como se observa en la figura 3.

El cuello: Región de tejido indiferenciado situado inmediatamente después del escólex; es la zona no segmentada del cuerpo del parásito y produce por septación transversal a los proglótidos, que componen el estróbil; de ahí que la infección persista mientras el escólex y el cuello permanezcan unidos a la pared del intestino del hospedero.



Fig 3. ESCOLEX DE *Taenia solium* SE PUEDE APRECIAR A SIMPLE VISTA EL ESCOLEX Y UN PAR DE VENTOSAS

El estróbilo: Está constituido por un número variable de segmentos llamados proglótidos, que aumentan su grado de madurez a medida que se alejan del cuello. En el extremo más próximo se encuentran los proglótidos inmaduros, en los que apenas se distinguen las formas celulares que originan los genitales masculinos y femeninos que alberga cada segmento, ya que es hermafrodita; a continuación se encuentran los proglótidos maduros, de forma cuadrangular, en los que se observan los órganos reproductores completamente desarrollados conteniendo entre 150 y 200 testículos. En la porción final del estróbilo se localizan los proglótidos grávidos de forma rectangular, ocupados casi en su totalidad por el útero que presenta entre siete y trece ramas como rasgo específico, con los órganos sexuales atrofiados y llenos de huevos (Willms K & Sotelo J., 2001).

Los céstodos carecen de sistema digestivo, en su lugar, poseen una superficie externa o tegumento de gran importancia fisiológica, con actividad metabólica, a través de ella absorben y excretan selectivamente, ya sea por difusión o por transporte activo las sustancias que requieren para su deshecho, defensa o nutrición. La glucosa es el nutriente más importante como fuente de energía en los céstodos. También los aminoácidos, purinas, pirimidinas y nucleósidos son absorbidos del intestino por difusión facilitada, para sintetizar sus propias vitaminas y ácidos nucleicos (Schmidt G. & Roberts L., 2000). Este tejido llamado tegumento, es una cubierta externa del cuerpo; es un sincicio anucleado cubierto de extensiones citoplásmicas, variables en tamaño y número (microvellosidades) que cubren toda la superficie del parásito, amplificando el área de absorción del gusano. El tegumento contiene enzimas; sistemas específicos para el transporte de moléculas y iones, es un órgano de protección, auxiliar en la locomoción y sitio de transferencia metabólica. Se ha demostrado que algunos parásitos pueden metabolizar xenobióticos (sustancias químicas que son externas al organismo),

incluyendo algunos antiparasitarios (Tracy J. & Vande E., 1995). El elemento más externo del tegumento es el glicocálix, una cubierta protectora que inactiva algunas enzimas del hospedero y contiene amilasas utilizadas para degradar azúcares complejos. Una característica común es la presencia de células subtegumentales que forman un sincicio y que son delimitadas por una membrana basal.

Parenquima, tiene la función de sostén también considerado como centro de síntesis, transporte y almacenamiento de glucógeno, es un tejido sincitial y fibroso que limita el tegumento en el que se encuentran incluidos los órganos del aparato reproductor, excretor y del sistema nervioso, así como dos paquetes de fibras musculares que dividen el parenquima en dos zonas; cortical y medula r.

El sistema nervioso está constituido por el complejo de ganglios cerebroides en el escólex unidos mediante comisuras transversas. De los ganglios cerebroides salen cuatro cordones nerviosos amielínicos, dos anteriores que inervan el escólex y dos posteriores que corren a lo largo del estróbilo, inervándolo totalmente y conectándose por medio de comisuras transversas interproglotideas. Las fibras nerviosas se extienden a lo largo de los proglótidos con conexiones laterales. Algunos de los neuropéptidos de importancia en la transmisión de estímulos son la serotonina y la acetilcolina.

La osmoregulación y la excreción dependen de un sistema protonefridial, con 2 pares de canales laterales y conexiones transversas. El aparato excretor, está formado por células flamíferas, dispuestas en grupos de cuatro en el extremo libre de los túbulos. Estos últimos son prolongaciones capilares de los túbulos colectores que contienen moléculas solubles (urea, amoníaco) por lo general, son cuatro, dos dorsolaterales y dos ventrolaterales; los cuatro corren paralelamente a lo largo del estróbilo uniéndose a nivel del escólex. Los ventrales se conectan entre sí en el extremo posterior de cada segmento, por medio de un tubo transversal (Lamothe A. & García P., 1988).

El sistema reproductor, se considera hermafrodita; los órganos reproductivos femeninos y masculinos están presentes en cada segmento de un solo individuo.

1.1.4 CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico de *Taenia solium* consta de tres estadios: adulto, larva y huevo. Los dos primeros estadios se desarrollan en el humano y en el cerdo respectivamente, mientras que los huevos se diseminan y se mantienen latentes en el medio ambiente. El humano es el único hospedero definitivo, ya que es la única especie que aloja a la forma adulta del parásito, mientras que por otro lado tanto el cerdo como el humano pueden actuar como hospederos intermediarios a la forma larvaria o cisticerco.

El parásito adulto habita en el tubo digestivo del ser humano, donde se mantiene firmemente adherido a la pared intestinal mediante sus ventosas y ganchos. Cada

día, varios proglótidos grávidos se separan del extremo distal de la *Taenia* y son expulsados con las heces. Aproximadamente cada proglótido diariamente libera 300000 huevos en el ambiente y pueden permanecer viables durante largo tiempo, con capacidad de infectar a seres humanos y a cerdos causando cisticercosis. En lugares donde la eliminación de excretas es inadecuada, los cerdos se alimentan con heces humanas e ingieren los huevos de la *Taenia solium*. Una vez ingeridos por el cerdo, los huevos pierden su cubierta y se liberan las oncosferas (embriones hexacantos), los que atraviesan la pared intestinal y entran al flujo sanguíneo desde donde son transportados a los tejidos del cerdo, principalmente músculos estriados y cerebro (cisticercosis y neurocisticercosis). En dichos tejidos, las oncosferas evolucionan y se transforman en larvas ó cisticercos. Cuando el hombre ingiere alimentos o agua contaminada con cisticercos, las larvas evaginan en el intestino delgado (figura 4), el escólex se adhiere a la pared intestinal y el cuerpo del parásito comienza a crecer y a formar proglótidos (Carpio A., 2002)

Por otra parte, el hombre puede también convertirse en hospedero intermediario de la *T. solium* al ingerir sus huevos; bajo estas circunstancias, se desarrolla la cisticercosis humana. El mecanismo por el cual los huevos entran al torrente sanguíneo y son distribuidos a los tejidos del hombre es similar al descrito en los cerdos. Las formas principales de contagio humano incluyen ingestión de comida contaminada con huevos de *T. solium* y contaminación ano-mano-boca en individuos portadores del adulto de *T. solium* en su intestino, los que pueden auto-infectarse o infectar a otras personas, sobretodo a sus contactos domésticos. La transmisión aérea de huevos y la regurgitación de proglótidos desde el intestino delgado hacia el estómago (auto-infección interna) no han sido adecuadamente demostrado como fuentes importantes de adquisición de la enfermedad.

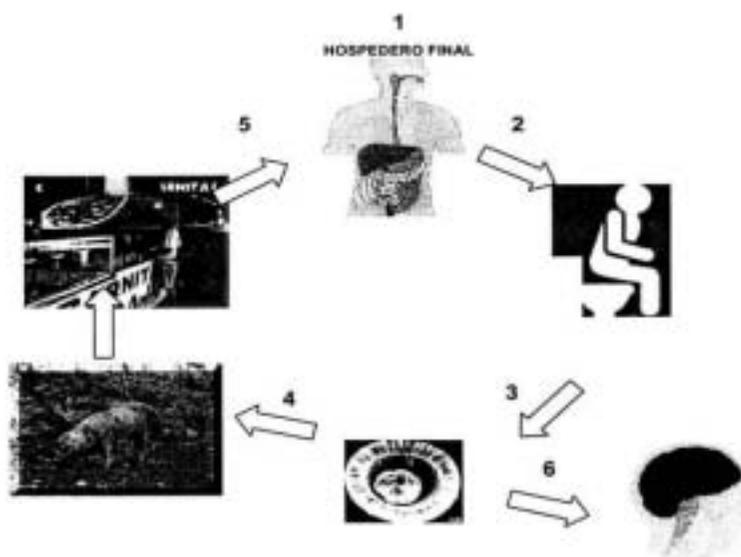


Fig 4. CICLO DE VIDA DE *Taenia.solium* (1) EL ADULTO HABITA EL INTESTINO DELGADO DEL HUMANO (2) LIBERACIÓN DE HUEVOS EN HECES (3) DISEMINACIÓN DE LOS HUEVOS AL MEDIO AMBIENTE (4) INFECCIÓN DE CERDOS POR INGESTA DE HUEVOS (5) INFECCIÓN EN HUMANOS POR INGESTA DE CARNE DE CERDO CON CISTICERCOS (6) INFECCIÓN DE HUMANOS POR INGESTA DE HUEVOS.

1.2 TAENIOSIS Y CISTICERCOSIS

La taeniosis y la cisticercosis cuyo agente etiológico es *T. solium*; prevalecen tanto en áreas urbanas como rurales, donde se asocian a las prácticas tradicionales de crianza de cerdos, malas condiciones sanitarias e higiénicas, ignorancia y pobreza en países en donde las condiciones sanitarias de los cerdos que se comen son bajas, además se desarrolla en ciudades como resultado de una migración creciente.

1.2.1 TAENIOSIS

La taeniosis; es una parasitosis causada por el adulto de *T. solium*; también conocido como solitaria (llamada así porque generalmente se encuentra una sola) es importante desde el punto de vista de salud pública, por que contribuye a la dispersión de la enfermedad, ya que la ingestión de sus huevos producirá en el hombre la cisticercosis, que con frecuencia es causa de muerte; produciendo ésta última un problema de salud pública. Su cuadro clínico es poco característico y de poca gravedad; Su diagnóstico se realiza por la búsqueda de los proglótidos en la materia fecal, por medio de tamizado, la búsqueda de huevos en los exámenes

coproparasitoscópicos, o por el método de Graham para la búsqueda de huevos en las márgenes del ano.

1.2.2 CISTICEROSIS

La cisticercosis también conocida comúnmente como: granos, granillo, alfilerillo, fresilla, tomatillo, sapo, zahuate, liendrilla, granizo ó gusano vesiculoso de la carne del cerdo (Lamothe A. & García P., 1988); ocurre como consecuencia de la infección por el estadio larvario de la *T. solium*, la cual se produce cuando el hombre se convierte, en forma accidental, en el hospedero intermediario de dicho céstodo (Marcial-Rojas R., 1977) localizándose en diversas partes del cuerpo como: mucosas, ojo, músculo teniendo el parásito una predisposición particular por afectar el sistema nervioso, produciendo la enfermedad denominada neurocisticercosis, de su ubicación en las diversas partes del cuerpo, y no tanto de su número, depende la gravedad de las lesiones que producen, pudiendo pasar inadvertida como en el caso de la cisticercosis muscular; o causando severos trastornos, desde dolor de cabeza, desequilibrio y parálisis en uno o varios miembros, hasta epilepsia, ceguera, hidrocefalia, demencia, déficit neurológico focal, e incluso la muerte en el caso de la neurocisticercosis (Barry M, Kaldjian L., 1993)

La neurocisticercosis es la enfermedad parasitaria más frecuente del sistema nervioso central, representando una patología neurológica común, así como un serio problema de salud pública en diferentes países de América Latina, África y Asia (Botero D., 1986, Díaz F., *et al.*, 1992).

1.2.3 EPIDEMIOLOGÍA DE LA CISTICEROSIS

Las frecuencias de infecciones con *T. solium* informadas en México son: de 1986 a 1990, en donde se notificaron alrededor de 13000 casos anuales. A partir de 1991 la notificación ha sido menor, pues se reportaron alrededor de 8000 casos anuales de *Taenia* sp. (Correa M., *et al.*, 1994)

Las estadísticas informan que las frecuencias más altas para *Taenia* sp se presentan en el grupo de 5 a 14 años (35.3%), seguido por el de 1 a 4 años de edad, sin diferencias significativas por sexo (Correa M., *et al.*, 1994) en cambio, los estudios epidemiológicos informan que el parásito adulto se presenta en todas las edades y que alcanza su pico en grupos de 16 a 45 años (edad económicamente productiva); asimismo, que las personas de sexo femenino son las que más frecuentemente presentan este parásito (Sarti E., 1986). Las diferencias encontradas se deben a que en las estadísticas sólo se reflejan la demanda de servicios de salud, y en los estudios epidemiológicos se obtienen datos representativos del sexo y de todos los grupos de edad.

1.2.3.1 CISTICERCOSIS HUMANA

La cisticercosis era una enfermedad rara en los Estados Unidos de América, por el contrario, México es un país que continúa endémico así como Sudamérica, principalmente en Brasil (Vianna L., *et al.*, 1990), Colombia(Botero D., 1986), Ecuador, Perú (Díaz F., 1992), y ciertos países de Europa del este (Díaz F., 1962) como España (García-Albea E., 1989) y Portugal (Monteiro L., *et al.*, 1992).

En México actualmente las estadísticas oficiales informan un promedio anual de 500 casos de cisticercosis, con una tasa nacional cruda de 0.6 por 100000 habitantes. No existen diferencias por sexo y el grupo más afectado es el de 16 a 45 años de edad. Los grupos más afectados son los que representan a las edades productivas (Correa M., *et al.*, 1994).

En los últimos 20 años se han utilizado diversas pruebas inmunodiagnósticas para determinar la frecuencia de anticuerpos anticisticercosis en diferentes poblaciones; al respecto se encontraron prevalencias desde 0.1 a 12.0%. Con el advenimiento de técnicas más sensibles y específicas, como el ELISA y la Inmunolectrotransferencia (IET), las frecuencias informadas en los últimos cinco años se han mantenido alrededor del 10% en las poblaciones estudiadas (Díaz S., *et al.*, 1990, Correa M., *et al.*, 1994, Sarti E., *et al.*, 1994).

La prevalencia exacta de la neurocisticercosis es muy difícil de determinar debido a la inespecificidad de sus manifestaciones clínicas y de la falta de una prueba completamente confiable y segura, que pueda ser utilizada en estudios epidemiológicos a gran escala.

Los primeros estudios para conocer la frecuencia de neurocisticercosis se realizaron en hospitales y en series de necropsias. En los estudios hospitalarios, México informó frecuencias de hasta 8.60 x 100 hospitalizados, y en las series de necropsias, de hasta 2453 por 100 000 habitantes, y se señala que hasta 43.3% de los casos eran asintomáticos, y 80% fueron hallazgo de autopsia.(Sarti E., 1986).

Por otra parte, diversos estudios revelan que la neurocisticercosis es causa importante de admisiones hospitalarias y de procedimientos neuroquirúrgicos en México (Flisser A., *et al.*, 2003).

1.3 TRATAMIENTO DE LA CISTICERCOSIS

El tratamiento es sintomatológico y debe estar diseñado para cada paciente con antiepilépticos, analgésicos, corticosteroides o una combinación de ellos. Se utilizan de manera rutinaria antihelmínticos (prazicuantel y albendazol), en dosis definitivas y específicas para el tratamiento.

Debido al pleomorfismo clínico de la neurocisticercosis, no es posible que un solo esquema de tratamiento sea útil en todos los casos. Por lo tanto, la caracterización precisa de la enfermedad, en lo que respecta a viabilidad y localización de las lesiones, es de fundamental importancia con el objeto de planificar un tratamiento adecuado (Del Brutto O., 1993).

1.4.1 ANTIHELMÍNTICOS

Los antihelmínticos son fármacos que destruyen o expulsan a los helmintos del tubo digestivo o, al nivel sistémico que invaden órganos y tejidos. El tratamiento de la taeniosis, ha pasado por varias etapas; durante mucho tiempo se emplearon, semillas de calabaza como vermífugos los extractos de ciertas plantas, como el quenopodio, el helecho macho, mepacrina, el epazote, y derivados de acridínicos (Tay-Zavala J. & Lara-Aguilera R. 1995); pero las reacciones secundarias y la escasa acción antihelmíntica las hicieron caer en desuso, además estos no tienen ningún efecto sobre las formas larvarias. Para el tratamiento de la cisticercosis y la teniosis se utilizan fármacos sintéticos dentro de los cuales los más utilizados son el Praziquantel, el Albendazol y la niclosamida (Sarti E., 1986).

Praziquantel: Es una isoquinolina que ha sido utilizada para el tratamiento de la neurocisticercosis humana desde 1979, ejerce dos efectos importantes en helmintos sensibles; a las concentraciones mínimas eficaces, intensifica la actividad muscular seguida de contracción y parálisis espástica. Los céstodos se separan de los tejidos del hospedero. A concentraciones terapéuticas levemente mayores, el praziquantel causa daño en tegumentos, lo que activa los mecanismos de defensa del hospedero para culminar la destrucción del parásito. Las membranas de los helmintos afectados al parecer constituyen el objetivo primario de su acción. Por último cabe señalar que el praziquantel es el tratamiento de elección recomendado por la OMS a una dosis única. 10 mg/kg (OMS, 2002).

Albendazol: Es un benzimidazol con potente efecto cestocida, altamente eficaz en la neurocisticercosis. Los benzimidazoles causan muchos cambios bioquímicos, por ejemplo la inhibición de fumarato reductasa de mitocondrias, disminución del transporte de glucosa, y desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Su principal acción es la inhibición de la polimerización de microtúbulos al unirse a β -tubulina. La toxicidad selectiva de estos compuestos depende de la actividad específica y muy ávida con la β -tubulina del parásito se produce con concentraciones mucho menores que las necesarias para unirse a las proteínas de mamíferos. Después de administrar el albendazol es metabolizado en el hígado, hasta la forma de sulfóxido de albendazol, el cual tiene actividad antihelmíntica. El albenbazol ocasiona pocos efectos adversos si se utiliza por corto tiempo contra la helmintiasis gastrointestinal. El albendazol destruye el 75% a 90% de los cisticercos y ha probado ser superior al praziquantel en diversos estudios comparativos (Cruz M., *et al.*, 1991), no solamente por su mejor porcentaje de destrucción también por su menor costo, un aspecto importante ya que la cisticercosis usualmente afecta a gente de bajos recursos económicos. dosis 15mg/kg/día por 1 mes.(Goodman & Gilman., 2001)).

1.4.2 ANTIEPILEPTICOS

Los antiepilépticos son utilizados en un gran número de enfermos con neurocisticercosis. En pacientes con epilepsia secundaria a calcificaciones, la administración de una droga antiepiléptica de primera línea (carbamazepina, fenitoina o fenobarbital) usualmente produce un control adecuado de las crisis. Sin embargo, los pacientes con quistes viables deben recibir primero un curso de tratamiento con drogas cestocidas para lograr un control posterior de crisis con fármacos antiepilépticos (Pal Deb K., *et al.*, 2000).

1.4.3 CORTICOSTEROIDES

Los corticosteroides son fármacos frecuentemente utilizados en pacientes con neurocisticercosis. La administración simultánea de corticosteroides durante el tratamiento cestocida es controversial. Se ha sugerido su empleo para disminuir los efectos adversos que pueden ocurrir durante el tratamiento con albendazol o praziquantel (DeGhetaldi L., 1983). Dichos efectos no se deben a toxicidad de estos fármacos sino a la destrucción de los cisticercos como resultado del tratamiento. En la mayoría de los casos, estos efectos secundarios pueden ser controlados adecuadamente con analgésicos comunes y fármacos antieméticos, evitando el uso rutinario de corticosteroides. Este aspecto es de especial importancia en enfermos tratados con praziquantel ya que la administración simultánea de corticosteroides disminuye hasta en 50% los niveles plasmáticos de dicho fármaco. Por el contrario, los niveles plasmáticos de albendazol aumentan con la administración de corticosteroides por lo que pueden ser utilizados libremente en estos casos (Jung H., *et al.*, 1990).

1.4.4 CIRUGÍA

Los cisticercos ventriculares móviles pueden ser removidos por excéresis quirúrgica o por aspiración endoscópica (Neal J., 1995). Hay que considerar la posibilidad de que el cisticerco haya migrado en el interior del sistema ventricular desde el momento del diagnóstico, por lo que es necesaria la práctica de estudios de neuroimagen inmediatamente antes de la cirugía (Kramer J., *et al.*, 1992)].

1.4 PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA CISTICERCOSIS

Existen características que hacen a la *T. solium* vulnerable: a) su ciclo de vida requiere exclusivamente al ser humano como su hospedero definitivo; b) la taeniosis es la única fuente de infección para el cerdo, hospedero intermediario; c) el cerdo puede ser controlado; d) no existen reservorios silvestres, y e) se dispone de productos antiparasitarios seguros y eficaces contra la taeniosis (Schantz P., *et al.*, 1993)

El control de la taeniosis y cisticercosis, se han dividido en dos estrategias las educativas y las de intervención. Las educativas se enfocan a la difusión de la información para prevenir la adquisición del parásito, como hábitos de higiene,

identificación de carne infectada, cocimiento de ésta, evitar el fecalismo al aire libre (Sarti E., et al., 1992). Factores socioeconómicos y culturales han influido para que este tipo de campañas no tengan aun el impacto esperado en la población.

Se han propuesto otras alternativas de intervención que aún no han sido suficientemente evaluadas, como es el caso de tratamiento masivo con antihelmínticos para la erradicación del gusano adulto de los portadores, en donde se administra una dosis única de prazicuantel y se observa que disminuye la incidencia de la cisticercosis. Otra alternativa de intervención es la educación que consiste en la divulgación del conocimiento acerca de la enfermedad en comunidades endémicas, con el objetivo de modificar las practicas y el comportamiento de la localidad estudios realizados en donde se han aplicado estas medidas demuestran que se ha disminuido la incidencia de la enfermedad (Flisser A., et al., 2003). Junto con estas medidas se han desarrollado vacunas contra la cisticercosis con preparaciones antigénicas (extractos crudos) a partir de estadios oncosferales, larvarios y adultos de diferentes céstodos (Molinari J., et al., 1983); como ejemplo de ello tenemos dos antígenos provenientes de una biblioteca de cDNA de *T. crassiceps*, un antígeno recombinante proveniente de *T. ovis* que protege 78% en cerdos infectados con *T. solium* y tres péptidos provenientes de *T. crassiceps* disminuyendo la carga parasitaria en un 50% en cerdos infectados (Toledo A., et al., 2001), así como un complejo antigénico a partir de cisticercos de *T. solium* los cuales han demostrado ser efectivas en la protección contra la cisticercosis porcina y murina (Molinari J., et al., 1983,1993, Manoutcharian K., et al., 1996)

La aplicación de las tecnologías de ácido ADN recombinante han permitido la producción de antígenos recombinantes útiles para la vacunación en contra de la cisticercosis (Vibanco-Perez N., et al., 1999, Manoutcharian., et al., 1996). Ésta es una valiosa herramienta, ya que permite obtener una mayor cantidad de antígeno, de tal forma que se pueden adecuar las dosis y bajar el costo de la producción del antígeno.

1.5 DIAGNÓSTICO DE LA TAENIOSIS Y CISTICERCOSIS

1.6.1 TAENIOSIS

La taeniosis generalmente es asintomática, ya que produce daño mínimo en la mucosa intestinal. El diagnóstico se realiza por la identificación de proglótidos expulsados en el excremento, los cuales deben ser observados al microscopio para la identificación de la especie, o bien, por el análisis de los huevos mediante técnicas coproparasitológicas de sedimentación y flotación, cuya sensibilidad no es mayor de 60% (Sarti E., 1986, Flisser A., 1994). Se han desarrollado métodos como inmunodiagnóstico de la taeniosis por detección de coproantígeno (Allan J., et al., 1990). Asimismo, se han empezado a implementar métodos moleculares empleando sondas o amplificando genes mitocondriales por medio de la reacción en cadena de la polimerasa a partir de DNA aislado de huevos y restos del

parásito encontrados en las heces de los portadores de *T. solium* y *T. saginata* (Chapman A., *et al.*, 1995). Sin embargo, estos métodos todavía no han mostrado su eficacia en población abierta.

1.6.2 CISTICERCOSIS

La única confirmación real de la patología es por medio de biopsia y autopsia, estos procedimientos presentan obvias limitaciones, únicamente la interpretación correcta de los exámenes de neuroimagen e inmunológicos permite el diagnóstico de la cisticercosis (Del Brutto O., 1994).

1.6.2.1 ESTUDIOS DE NEUROIMAGEN

Tanto la tomografía computarizada como la resonancia magnética (RM) facilitan el diagnóstico de la neurocisticercosis ya que permiten visualizar el número y localización de los parásitos así como su estadio evolutivo (Del Brutto O., 1992). De hecho, los hallazgos de TC y RM en la neurocisticercosis parenquimatosa dependen fundamentalmente del grado de viabilidad de los cisticercos. En términos generales, la RM es mejor que la TC para el diagnóstico de la neurocisticercosis, especialmente en pacientes con lesiones quísticas en la base del cráneo, tallo cerebral, cavidades ventriculares y médula espinal. Sin embargo, una limitación importante de la RM es su mala resolución para detectar pequeñas calcificaciones parenquimatosas (Richards F. Jr. & Schantz P., 1991). Debido a que muchos pacientes con epilepsia y neurocisticercosis presentan calcificaciones como única evidencia de la enfermedad, la práctica exclusiva de RM puede condicionar errores diagnósticos. La TC es el método de imagen de elección para el estudio de pacientes con probable neurocisticercosis; la RM debe reservarse para aquellos casos con TC normal o en los que el aspecto tomográfico de las lesiones no sea concluyente (Del Brutto O., 1994).

1.6.2.2 ANÁLISIS CITOQUÍMICO

La mayoría de los hallazgos de neuroimagen en la neurocisticercosis meníngea no son específicos y pueden observarse en otro tipo de infecciones del sistema nervioso. En estos casos, el análisis citoquímico del líquido cefalorraquídeo (LCR) es de fundamental importancia para el diagnóstico correcto (Del Brutto O., 1992,1994) los niveles de glucosa en LCR suelen ser normales en pacientes con neurocisticercosis (Leonard J., 1986).

1.6.2.3 PRUEBAS INMUNOLÓGICAS

Existen varias pruebas destinadas a la detección de anticuerpos anticisticercos en sangre, saliva y LCR, entre las que destacan la reacción de fijación de complemento, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y la

inmunoelctrotransferencia (IET) (Flisser A., *et al.*, 1990, Richards F. Jr. & Schantz P., 1991).

Estas pruebas son un complemento importante de los estudios de neuroimagen, pero nunca deben ser utilizadas en forma aislada para confirmar o descartar el diagnóstico de neurocisticercosis debido al elevado porcentaje de resultados falso-positivos y falso-negativos. De las pruebas serológicas, la más fidedigna es la IET realizada con glicoproteínas (García H., *et al.*, 1993).

La práctica de pruebas inmunológicas en LCR suele ser más confiable que en suero; sin embargo, la positividad de dichas pruebas se relaciona directamente con la viabilidad y la localización de los cisticercos (Zini D., *et al.*, 1990). Algunas de las proteínas de los cisticercos tienen propiedades antigénicas y estimulan la producción de anticuerpos específicos (Khan N. & Sotelo J., 1989). Sin embargo, estos antígenos no tienen mayor efecto en la protección contra la enfermedad ya que los cisticercos desarrollan una serie de mecanismo evasores que le permiten sobrevivir al ataque inmunológico del hospedero (Del Brutto O., 1993). Entre esos mecanismos destacan el mimetismo molecular y la depresión de la inmunidad celular, la cual puede condicionar una serie de complicaciones en enfermos con cisticercosis, así como en su diagnóstico.

1.6 ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo (EOx) se define como el desequilibrio entre las moléculas de alto potencial oxidante derivadas del oxígeno, conocidas como especies reactivas del oxígeno (ERO), y los sistemas antioxidantes.

Las principales sustancias oxidantes en los sistemas biológicos son los ERO. Estas moléculas presentan uno o más electrones sin aparear provenientes del oxígeno, esta moléculas son altamente reactivas dada su afinidad a aparearse con electrones de los átomos de otras moléculas. Por ejemplo, moléculas como el ión hidroxilo (HO^\cdot) y el peroxinitrito (ONOO^\cdot). entre otras.

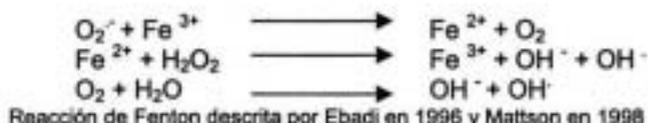
Las ERO se generan por la reducción incompleta del oxígeno durante la respiración en la mitocondria, como productos de reacciones metabólicas normales en la membrana citoplasmática, retículo endoplásmico, membrana plasmática, los peroxisomas (Cross A. & Jones O., 1991) y por macrófagos, neutrófilos y eosinófilos del hospedero (Southorn P. & Powis G., 1988). Estas especies causan daño a toda clase de moléculas biológicas conduciendo a la oxidación, despolimerización de polisacáridos, modificaciones de DNA ruptura de cadenas, daño a la membrana, lípidos, proteínas, carbohidratos, además de estar involucrados en procesos de mutagenesis, carcinogenesis, daño a la membrana, peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas, fragmentación y daño a carbohidratos (Sies H., 1993).

Contrario a lo que se piensa del O_2^\cdot es poco reactivo. La mayor parte del H_2O_2 proviene de la dismutación del O_2^\cdot . Tanto el O_2^\cdot como el H_2O_2 son compuestos

que reaccionan poco. Sin embargo ambos son tóxicos principalmente por que generan $^1\text{O}_2$ y HO^\cdot . Cuando se forma el superóxido es inmediatamente transformado mediante la superóxido dismutasa en peróxido de hidrógeno, como se observa en la siguiente reacción ($2\text{H}^+ + \text{O}_2^- + \text{O}_2^- \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$); a partir de aquí se pueden seguir tres vías.

1.-El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es metabolizado a agua y oxígeno.

2.-En presencia de hierro formar radicales hidroxilo (mediante la reacción de Fenton), el cuál es altamente tóxico para las células provocando la peroxidación lipídica, y ruptura o mutación del DNA



3.-En presencia de cloro a través del sistema enzimático de la mieloperoxidasa de los leucocitos se forma el ácido hipocloroso (anión hipoclorito). El ácido hipocloroso es el radical más tóxico y la especie mas reactiva formada por los fagocitos.

1.7 SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Todos los organismos aerobios requieren mecanismos que limiten el daño molecular causado por las ERO como el ión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el ión hidroxidrido (HO^\cdot) que son incrementadas por exposición a la radiación, ciclización redox de fármacos o fagocitos estimulados por el hospedero (Henkle-Dürsen K. & Kampkötter K., 2001).

Las ERO formadas en el organismo pueden iniciar una serie de reacciones en cadena, que continúan hasta que éstos son eliminados tras diversas reacciones con otros radicales libres o por la acción del sistema antioxidante, el cual protege a los tejidos de los efectos que ellos producen. Unos previenen la formación de nuevos radicales libres, convirtiéndolos en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar o evitando la formación de ERO a partir de otras moléculas.

Para detener este proceso destructivo los organismos han desarrollado sistemas enzimáticos y no enzimáticos de protección del daño producido por las ERO (Callahan H., et al., 1988). Esta protección contra el daño oxidativo puede ser por prevención, intercepción y reparación.

La prevención es la primera línea de defensa contra las ERO y es la protección contra su formación.

La intercepción de las ERO, este es el proceso de desactivación, lo podemos dividir en dos clases enzimáticos y no enzimáticos.:

1.- Sistemas no enzimáticos los cuales a su vez podemos subdividir en dos subclases: a) Sustancias eliminadoras o secuestradoras que son pequeñas moléculas que limpian el plasma de oxiradicales, un ejemplo de esto son el α -tocoferol ácido ascórbico, carotenos y glutatión. b) Sustancias proteicas que son capaces de secuestrar metales de transición sobre todo el hierro como la lactoferrina, la ceruloplasmina y la transferrina.

2.-Sistemas enzimáticos las tres principales enzimas antioxidantes son: la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa.

La protección de los efectos antioxidantes puede ser por reparación del daño una vez ocurrido, este se refiere al daño en el DNA ocurrido como una variedad de productos de la oxidación de fosfolípidos, proteínas y otros compuestos. Hay varios sistemas enzimáticos relacionados con la reparación de DNA lipofílicos y proteolíticos capaces de ayudar a las funciones de resustitución o reemplazamiento (Hemut S, 1993).

1.8.1 SISTEMAS ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

Los antioxidantes más eficientes combinan propiedades en dos objetivos fundamentales; primero reaccionando en el inicio de la formación de estos, y segundo son capaces de interactuar con compuestos solubles en agua para su propia generación. Estos antioxidantes capturan a los radicales libres impidiendo la reacción en cadena por medio de la acción de compuestos de alto peso molecular; algunos solubles en agua como ácido ascórbico tioles, urato y piruvato, algunos lípidos solubles como la vitamina E y el β -caroteno y finalmente otros reparan las células dañadas (Brophy P. & Pritchard D., 1988).

1.8.2 SISTEMAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Los sistemas enzimáticos están conformados por una serie de enzimas antioxidantes esenciales en los parásitos para defenderse contra las ERO generadas por macrófagos neutrofilos y eosinófilos del hospedero (James E., 1994), por algunos fármacos antiparasitarios, la reducción incompleta del oxígeno durante la respiración en la mitocondria y como productos de reacciones metabólicas normales en la membrana citoplasmática, retículo endoplásmico, membrana plasmática y los peroxisomas (Henkle-Dührsen K., *et al*, 2001).

Estas enzimas pueden ser particularmente importantes para la larga vida de los parásitos que están envueltos en infecciones crónicas. Las principales familias de enzimas antioxidantes en organismos eucariontes son las catalasas (CATs), las Glutatión peroxidasas (GPXs) con actividad catalítica para descomponer H_2O_2 para producir H_2O y O_2). También las GPXs y las Glutatión S-transferasas que utilizan al glutatión, pueden reducir hidroperóxidos lipídicos y carbonilos reactivos. Las superóxido dismutasas (SODs) son una familia de metaloenzimas las cuales catalizan la dismutación del superóxido (O_2^-) a H_2O_2 y oxígeno. El H_2O_2 puede

causar daño por sí mismo, pero la especie más importante es el OH^\cdot . Recientemente otra familia de enzimas antioxidantes que utilizan al H_2O_2 e hidroperóxidos, descritas como peroxiredoxinas (PRXs) han sido identificadas en organismos de todos los reinos, incluyendo a los nematodos y trematodos (McGonigle S., *et al.*, 1998). El descubrimiento de este sistema enzimático representa un avance para el entendimiento de cómo los parásitos se defienden del estrés oxidativo externo e interno, puesto que carecen de GPXs y CATs.

La superóxido dismutasa representa la primera línea de defensa convirtiendo al ión superóxido a peróxido de hidrógeno. Es una reacción que metabólicamente es poco costosa ya que no requiere el consumo de ningún cofactor.

1.8.3 SUPERÓXIDO DISMUTASAS EN HELMINTOS

La superóxido dismutasa (SOD) es una metaloenzima ampliamente distribuida existe en una variedad de formas compuestas de Cu/Zn, de Mn y Fe que catalizan la misma reacción ($2\text{H}^+ + \text{O}_2^\cdot + \text{O}_2^\cdot \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$); ésta última identificada en protozoarios, algas y organismos fotosintéticos. Hay tres tipos de SODs en organismos eucariontes una SOD celular de Cu/Zn en el citosol, una SOD extracelular de Cu/Zn y una SOD mitocondrial de Mn, a pesar de que estas tres enzimas catalizan la misma reacción cada una es codificada por un diferente gen y difieren en su estructura y localización (Fridovich I., 1995). La SOD citoplásmica de Cu/Zn se encuentra ampliamente distribuida en el citosol y en el núcleo, pero está ausente en la mitocondria y compartimentos secretorios (Crapo J., *et al.*, 1992) La SOD extracelular se encuentra fuera de las células en el plasma linfa y fluido cerebro espinal, mientras la SOD de Mn está localizada en la matriz de la mitocondria (Crapo J., 1992). La SOD de Cu/Zn celular es un dímero compuesto de dos subunidades idénticas de 16 kDa, cada una contiene un átomo de cobre y uno de zinc, la SOD extracelular de Cu/Zn es una glicoproteína tetramérica compuesta de cuatro subunidades idénticas con un peso molecular de 30 kDa. La SOD celular y la extracelular tienen un 50% de identidad en la secuencia de aminoácidos. Las enzimas de ambas clases poseen residuos conservados que son requeridos para la actividad y unión al metal: cuatro residuos de histidina envueltos en la unión al cobre, tres histidinas y un aspartato envueltos en la unión al zinc, dos cisteínas envueltas en el puente disulfuro y la arginina en la entrada del sitio activo en ambas formas citosólica y extracelular de esta enzima solo los átomos de cobre participan en la ciclización oxidoreducción durante la dismutación de O_2^\cdot . Los átomos de zinc no están involucrados en el ciclo redox pero mantienen la configuración del sitio activo y facilitan la oxidación.

La SOD Mn mitocondrial es una proteína tetramérica que es codificada en el núcleo, sintetizada como un precursor con un péptido señal en el citosol y transportada hacia dentro de la matriz de la mitocondria, donde pierde este péptido. La proteína precursora presenta un peso molecular de 25 kDa y la proteína madura dentro de la mitocondria un peso molecular de 22 kDa, la cual forma un tetrámero activo.

La SOD está presente en extractos de algunas especies de trematodos como *Dicrocoelium dentriticum*, *Fasciola hepatica* y cestodos como *Moniezia expansa*, *Moniezia benedeni*, *Avitellina centripunctata*, *Taenia hydatigena* y *Dipylidium caninum* (Sánchez Moreno M., et al., 1989). Además, de la SOD de *T. solium* (González R., et al., 2002). Asimismo, se han realizado caracterizaciones moleculares amplias en nematodos por medio de la identificación de los genes que las codifican, tal es el caso para la SOD de Cu/Zn citosólica (Henkle K., et al., 1991), la extracelular de Cu/Zn (Getzoff E., 1989), en *O. volvulus* (Henkle-Dührsen K., et al., 1994). Además de las SODs de Cu/Zn citosólica y extracelular de *B. malayi* (Tang L., et al., 1994), *Haemonchus concortus* (Liddell S. & Knox D., 1998), *D. immitis* (James E., 1994), la SODs de Cu/Zn extracelular de *Acanthocheilium viteae* (Lattemann C., et al., 1999) y la SOD de Cu/Zn citosólica de *Taenia solium* (Castellanos A., et al., 2002).

Todos estos estudios han hecho posible la producción de enzimas recombinantes, para realizar estudios bioquímicos e inmunológicos (Tang L., et al., 1994).

2. HIPÓTESIS

EL O_2^- ES UNA MOLÉCULA TÓXICA QUE CAUSA DAÑO POR SI MISMO O GENERANDO OTRAS MOLÉCULAS MÁS TÓXICAS. LA PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA NOS PERMITIRÁ IDENTIFICAR NUEVAS ESTRATEGIAS PARA INHIBIR SU FUNCIÓN.

3. OBJETIVO GENERAL

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA DE Cu/Zn RECOMBINANTE DE *Taenia solium*.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

PURIFICACIÓN DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA RECOMBINANTE DE Cu/Zn.

DETERMINACIÓN DE RENDIMIENTO DE LA PURIFICACIÓN Y PUREZA.

IMPLEMENTACIÓN DEL ENSAYO DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA.

ENSAYOS DE INHIBICIÓN:

- a) INHIBIDORES ESPECÍFICOS PARA LA SOD.
- b) FÁRMACOS ANTIHELMÍNTICOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

La *Escherichia coli* BL21(DE) fue de la marca comercial InVitrogen Corp. El plásmido que expresa la SOD de Cu/Zn de *T. solium* (TsSOD) fue producido en el laboratorio. Todos los demás reactivos fueron de la mejor calidad disponible comercialmente.

5.2 TRANSFORMACIÓN E INDUCCIÓN

La bacteria *E.coli* BL21(DE) fue transformada con 2µg DNA de la construcción de un plásmido que contiene la región codificante de la TsSOD y 100 µL de bacterias de la cepa descrita. Las bacterias se incubaron en hielo durante 1h; para después someterlas a un choque térmico de 1 min a 42°C. Para la recuperación se adicionaron 200 µL de medio SOC (InVitrogen Corp) y se incubaron a 37°C durante 30 min, posteriormente se incubaron las bacterias durante toda la noche en 10 mL de medio LB (ANEXO) con 50 µg/mL de ampicilina. Este cultivo se diluyó 1:50 en LB y se creció a 37°C hasta una $DO_{600nm} = 0.6$, en éste momento se adicionaron $ZnSO_4$ y $CuSO_4$ 0.17mM y se indujo con IPTG 1mM; se continuó creciendo el cultivo a 37°C por 6 horas. La inducción de la enzima se observó mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

5.3 PURIFICACIÓN

La purificación se realizó por el método descrito por Castellanos *et.al* (2002) modificado. La bacteria fue centrifugada a 3500 rpm por 30 min y el precipitado se lavó con PBS 3X (ANEXO) frío hasta obtener un color amarillo paja. La bacteria se resuspendió en amortiguador A conteniendo Tris-HCl 50mM pH 7.5 (ANEXO) y se homogeneizó en un polítron (Brinkmann Inst.) por 30 segundos cada 5 min por 6 ocasiones en un tubo falcon de 50mL sobre hielo. La suspensión fue cenrifugada a 11000 gX en una ultracentrifuga Avanti rotor 630. El sobrenadante obtenido se pasó por una columna DEAE-celulosa (Sigma) previamente equilibrada en amortiguador A. La columna fue lavada tres veces con el mismo amortiguador. Después de cargar la proteína a la columna se colectó el primer lavado. Las proteínas unidas a la columna fueron eluidas utilizando una solución 1 M de NaCl en amortiguador A. Las fracciones colectadas con actividad de SOD fueron dializadas en amortiguador B (50mM tris-HCl pH 8.9) y pasadas por la misma columna de DEAE, siguiendo el mismo procedimiento que en la anterior, pero utilizando el amortiguador B. Una vez más las fracciones con actividad específica de SOD fueron colectadas, dializadas y concentradas. El contenido de proteínas en las fracciones fue determinado por el método de Lowry y la actividad específica de SOD fue determinada como se describe más adelante. El flujo de ambas columnas fue de 5mL/min y las fracciones colectadas de 1mL.

5.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS (Método de lowry)

La determinación de la cantidad de proteína se realizó mediante el método de Lowry (1951). Método colorimétrico basado en la formación de un complejo de colorido entre el cobre y los nitrógenos de los enlaces peptídicos. Para resaltar el color formado en esta reacción, se hace reaccionar con el reactivo de Folin que al ser reducido por los residuos de aminoácidos aromáticos tirosina y triptofano producen un color azulado que es posible medir en el espectrofotómetro. Explicando brevemente, se tomaron 50µL de cada uno de los extractos y las muestras y se diluyeron hasta un volumen final de 200µL, a cada tubo se agregó y mezcló 1mL de solución C (ANEXO) y se dejó reaccionar por 10 min, después se agregaron 100µL de reactivo de folin diluido 1:1 en agua; se puso a reaccionar durante 45 min, luego se midió su densidad óptica a 660 nm usando como blanco agua y una curva patron de albúmina de bovino.

5.5 ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA AL CON SDS (PAGE-SDS)

Las composición de todas las muestras obtenidas se determinaron en PAGE-SDS al 12.5% descrito por Laemmli (1970). De las muestras complejas como extractos crudos o fracciones semipurificadas se utilizaron 10µg y de proteínas puras 2.5µg. Las muestras se prepararon en el amortiguador de Laemmli con 10µL de mercaptoetanol, calentadas por 5min a 100 °C, cargadas en los geles y separadas a 100 V. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie. Los pesos moleculares relativos se determinaron por la comparación con la migración de estándares de peso molecular conocido.

5.6 ENSAYOS DE ACTIVIDAD (Método de xantina-xantina oxidasa)

La actividad de la enzima fue determinada por el método de McCord y Fridovich, (1969). Método de actividad basado en la reacción de la xantina con la xantina oxidasa para generar el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que a su vez reduce al citocromo C, el cual puede ser medido en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550nm. La actividad fue determinada midiendo la inhibición de la reducción de citocromo C (figura 5). Se adicionó en la reacción amortiguador K_2HPO_4 50mM pH 7.8 (ANEXO) en un volumen final de 3mL, así como 0.1mM de xantina, 0.019mM de citocromo C, 20UE de SOD; y xantina oxidasa al momento de leer. La actividad se midió después de 2min de iniciar la reacción con la xantina oxidasa. El ensayo se estandarizó usando una SOD Cu/Zn de bovino. Una unidad de SOD es definida como la cantidad de SOD necesaria para producir la inhibición del 50% de citocromo C. La actividad específica se definieron como las unidades de actividad por mg de proteína y adicionada en tres diferentes ensayos.

5.7 ENSAYOS DE INHIBICIÓN

La inhibición de la actividad de la enzima fue determinada por el mismo método de xantina xantina-oxidasa previamente descrito. Para cada ensayo se realizó como control un ensayo que no contenía SOD, por lo tanto el 100% de citocromo se reduce. Como control positivo para el ensayo se usó una SOD Cu/Zn de *B. taurus* y/o una de *T. solium* pura con 100% de actividad, por lo que la reducción del citocromo se inhibe en presencia de la SOD. Se usaron inhibidores específicos para la SOD Cu/Zn (KCN) y Mn (NaN_3) a una concentración de 10mM, con 20U de la SOD recombinante. Los inhibidores fueron incubados a 37°C por 30 min con los inhibidores y la actividad determinada por el método de la xantina-xantina oxidasa. Para los estudios de inhibición con fármacos (ABZ, FBZ, MBZ, MTZ, PZQ, TBZ), Se adicionó el fármaco correspondiente a una concentración de 100 μM , mas 20UE de SOD recombinante en un volumen de 1 mL. La mezcla se incubó a 37°C por 30min, y se adicionaron 2 mL de amortiguador para tener un volumen final de 3 mL. También se probó una concentración de 500 μM para ABZ y TBZ. Como control de inhibición se utilizó la SOD Cu/Zn de bovino.

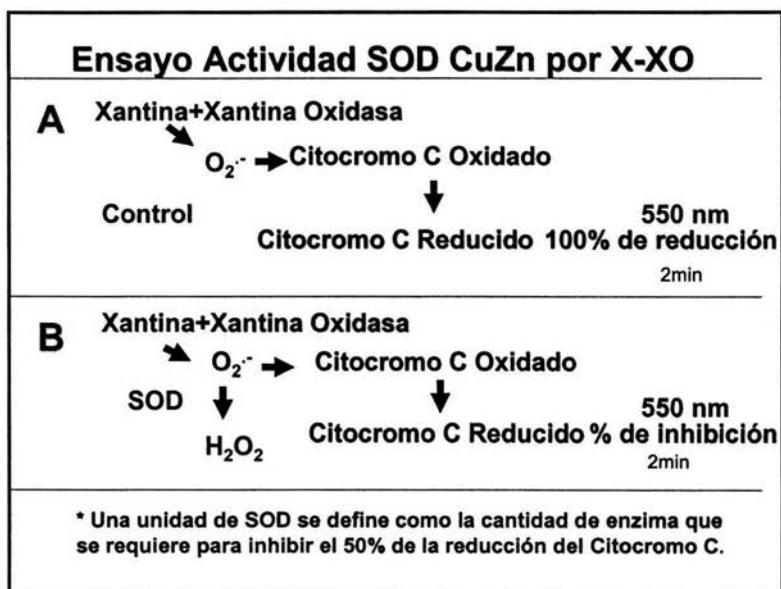


Fig 5. Ensayo de actividad SOD Cu/Zn por el método de Xantina-Xantina oxidasa. A; representa el 100% de reducción de citocromo C; el control del ensayo; B; representa la inhibición del citocromo C debida a la presencia de la SOD; la actividad de SOD.

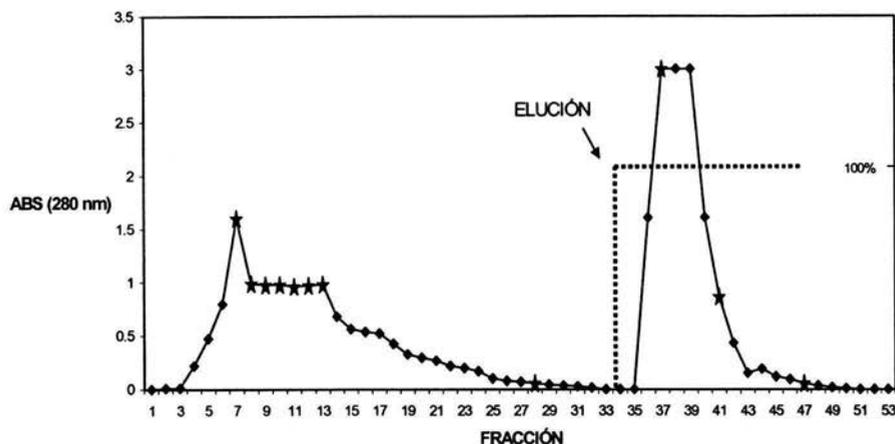
6. RESULTADOS

6.1 PURIFICACIÓN DE LA SOD DE Cu/Zn DE *Taenia solium*

Después de la ruptura de la bacteria que expresa la enzima recombinante y obtener un sobrenadante con actividad de SOD. Este sobrenadante fue pasado por una columna de DEAE-celulosa, previamente equilibrada con amortiguador A (pH 7.5). La figura 6 muestra los perfiles de las cromatografías realizadas para la purificación de la SOD Cu/Zn de *T. solium*. La figura 6A muestra la primera separación obtenida en esta columna en donde se obtuvieron 2 picos. El primer pico representa las proteínas determinadas a 280 nm que no se unen a la columna, y que presentan gran actividad de SOD. Un segundo pico que representa las proteínas unidas a la columna, que son despegadas con el amortiguador A conteniendo 1 M NaCl, y que presentan una débil actividad de SOD. El primer pico conteniendo la mayor actividad de SOD antes mencionado fue dializado contra amortiguador B con la finalidad de aumentar el pH a 8.9 y pasado por la misma columna de DEAE, previamente equilibrada con amortiguador B. La figura 6B, muestra el perfil cromatográfico de la segunda columna de DEAE, que fue similar al obtenido con la primera columna, donde el pico 1 representa el material no unido a la columna, y que no presenta actividad de SOD, mientras que el pico 2 representa el material unido a la columna y que es eluido con el amortiguador B con 1 M NaCl, que coincide con una gran actividad de SOD.

La Figura 7, un gel de poliacrilamida con SDS muestra la composición de cada uno de los pasos de la purificación de la SOD Cu/Zn recombinante llevada a cabo por las dos columnas de intercambio iónico utilizando DEAE. El carril 1 muestra una SOD Cu/Zn comercial de *Bos taurus* con un peso molecular de 16 kDa. El carril 2, un extracto total de la bacteria que contiene el plásmido que produce la enzima recombinante sin inducir solubilizado con amortiguador de cargado de Laemlli; se observa que la fracción esta compuesta por un gran número de proteínas en un rango de 10-200 kDa. El carril 3, es lo mismo que el carril 2, pero de una bacteria inducida con IPTG para producir la enzima recombinante, se observan las mismas proteínas del carril 2, resaltando la expresión de una proteína de 16 kDa. El carril 4 muestra que el sobrenadante obtenido después de la ruptura de la bacteria que expreso la SOD Cu/Zn recombinante de *T. solium*, se puede observar un patron similar al obtenido del carril 2, con algunas proteínas adicionales de pesos moleculares altos, que presenta gran actividad de SOD. El carril 5 muestra los componentes del primer pico obtenido de la primera columna de DEAE con amortiguador A, este pico esta compuesto en su mayoría por una proteína de 16 kDa, con pocas proteínas contaminantes, cabe mencionar que este pico coincidió con una gran actividad de SOD. En el carril 6 se observa la composición del segundo pico de la primera columna de DEAE, en el cuál a pesar de la tener una densidad óptica alta medida a 280 nm, se aprecian pocas proteínas y una muy baja actividad a SOD. En el carril 7 se observa el primer pico de la segunda columna de DEAE con amortiguador B (pH 8.9), que contiene pocas proteínas. Finalmente, el carril 8 muestra el segundo pico obtenido de la

CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO pH 7.5



CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO pH 8.9

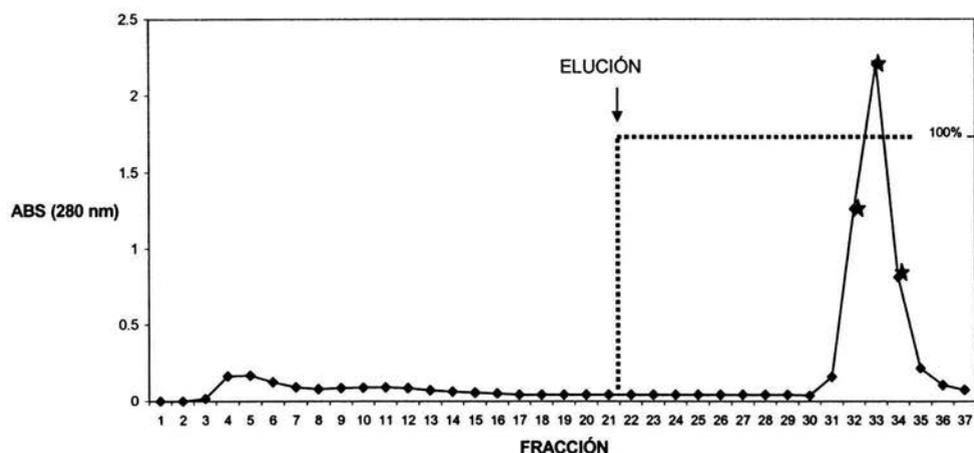


FIG 6. PURIFICACIÓN DE LA SOD Cu/Zn DE *T. solium*. A) CROMATOGRAMA DE LA PRIMERA CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO A pH 7.5: Pico 1, fracción no unida a la columna. Pico 2, fracción eluida con el gradiente salino. B) CROMATOGRAMA DE LA SEGUNDA CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO, pH 8.9: Pico 1, fracción no unida a la columna. Pico 2, fracción eluida con el gradiente salino. La línea continua (—) representa la cantidad de proteína en unidades de absorbancia (D.O. $_{280\text{ nm}}$) en el eje Y. El eje X representa cada fracción colectada de 1 mL. La línea discontinua (- - -) indica el momento en que se adicionó el amortiguador con NaCl. La escala del lado derecho representa el % de amortiguador de elución. La \blacksquare representa las fracciones en las que se determinó actividad específica.

segunda columna DEAE; en donde se puede apreciar una sola proteína de 16 kDa, que además posee una gran actividad de SOD.

La Tabla I, muestra el resumen de la purificación de SOD recombinante de Cu/Zn a partir de un cultivo bacteriano. Se puede observar que el método realizado purificó 12.50 veces la enzima, a partir de un sobrenadante obtenido después de romper a la bacteria; finalmente la enzima presenta una actividad específica de 13333.33 U/mg.

TABLA I. RESUMEN DE LA PURIFICACIÓN DE SOD DE *T.solium* .

PASO	VOLUMEN (mL)	PROTEINA (µg/µL)	TOTAL (mg)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/mg)	ACTIVIDAD TOTAL	REND %	VECES PURIFICADO
EXTRACTO CRUDO	5	7.2700	36.35	1066.66	38777.09	100.00	1.00
POST1 ^{ER} DEAE pH7.5	9	0.1170	1.05	4705.88	4955.29	12.78	4.00
POST 2 ^A DEAE pH8.9	3	0.3054	0.91	13333.33	12215.99	31.50	12.50

1 2 3 4 5 6 7 8

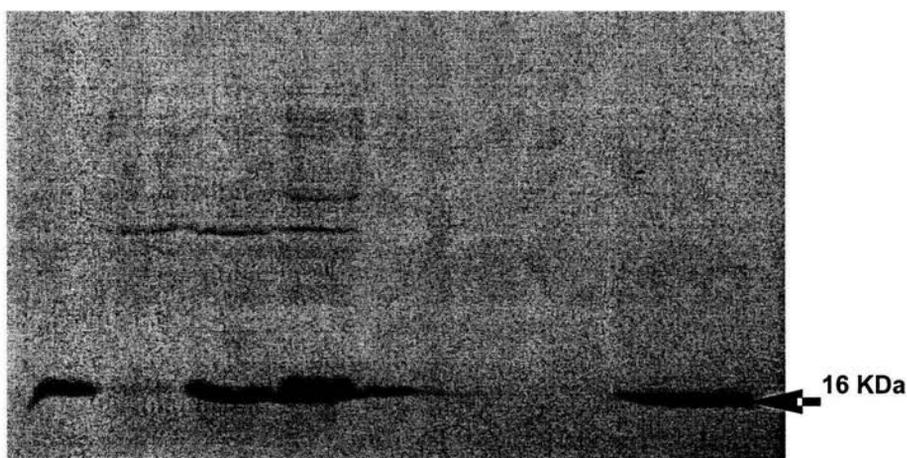


FIG 7. SDS PAGE AL 12.5% DE LA PURIFICACIÓN DE LA SOD Cu/Zn RECOMBINANTE DE *T. solium*. 1.- SOD Cu/Zn *B. Taurus*, 2.- Extracto Crudo de *E. coli* sin inducción, 3.-Extracto crudo de *E. coli* inducido, 4.-sobrenadante de la bacteria, 5.-Pico 1^{er} de primera DEAE, 6.- 2^{do} pico 1^{er} cromatografía 7.-1^{er} pico 2^{da} cromatografía, 8.-2^{do} pico 2^{da} cromatografía. La flecha indica la el peso molecular.

6.2 CARACTERIZACION ENZIMÁTICA DE LA SOD Cu/Zn DE *Taenia. solium*

6.2.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA.

El disponer de la SOD Cu/Zn de *T.solium* en grandes cantidades y pura nos permitió obtener su actividad específica, utilizando el ensayo de xantina-xantina oxidasa. Donde un ensayo sin SOD fue el control que representa el 100% de reducción de citocromo C. La figura 8 muestra los porcentajes de la inhibición del citocromo C, obtenidos con las diferentes concentraciones de la enzima SOD de *T. solium*. La interpolación de la cantidad de proteína que es necesaria para inhibir en un 50% la reducción del citocromo C, es definida como una unidad enzimática, la que dividida entre los miligramos, se define como la actividad específica de la enzima, que para este caso particular fue de 13333.3 (U/mg)

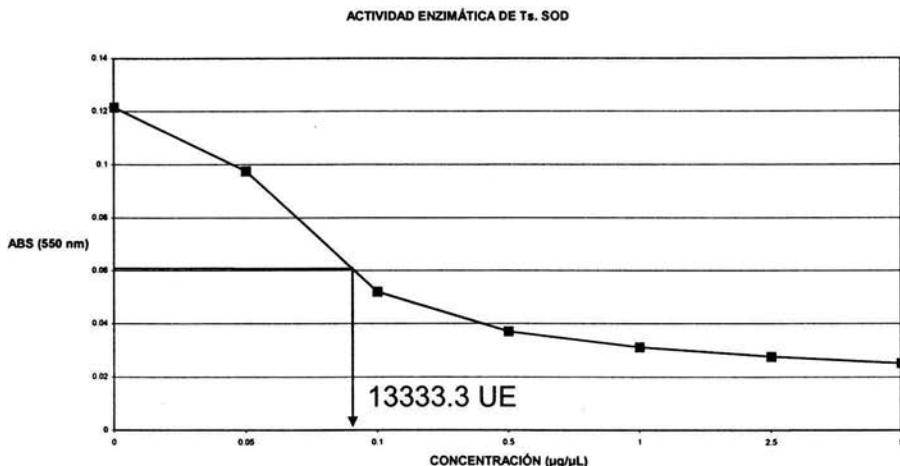


Fig 8. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE TsSOD. Una unidad de actividad se define como la cantidad de SOD requerida para inhibirla reducción de citocromo C al 50%. La flecha indica una unidad de actividad y junto a la flecha la actividad específica en unidades enzimáticas.

6.2.2 IDENTIFICACIÓN DEL COFACTOR METÁLICO:

Para determinar el cofactor metálico de la proteína se realizaron experimentos con concentraciones crecientes de KCN y NaN_3 en el ensayo de xantina xantina-oxidasa; estos compuestos son inhibidores de las SODs de Cu/Zn y de Mn, respectivamente. Los resultados demuestran que el KCN inhibe a la proteína en 14, 37, 85% de la actividad a concentraciones de 0.01, 0.1, 1mM, respectivamente y 100% a una concentración de 10mM. Por otro lado, los ensayos de inhibición realizados con el NaN_3 a las mismas concentraciones, no mostraron ningún efecto sobre la actividad de la enzima. Como control se utilizó la SOD Cu/Zn comercial de bovino la cual perdió su actividad a 10 mM de KCN.

Puesto que se ha observado que la *E. coli* expresa SOD de Cu/Zn y Mn. Se procedió a repetir los ensayos realizados en la Tabla I, pero utilizando el NaN_3 inhibidor específico de la SOD de Mn. La Tabla 2, muestra el resumen de la

purificación de SOD de Cu/Zn recombinante a partir del mismo cultivo bacteriano que expreso a SOD. Se puede observar que el rendimiento de la purificación fue de 39.05%, pero se obtuvo la misma actividad específica de 13333.33 U/ mg.

TABLA II. RESUMEN DE LA PURIFICACIÓN DE SOD Cu/Zn DE *T.solium*, UTILIZANDO EL INHIBIDOR ESPECÍFICO PARA LA SOD DE Mn (AZIDA).

PASO	VOLUMEN (mL)	PROTEINA (µg/µL)	TOTAL (mg)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/mg)	ACTIVIDAD TOTAL	REND %	VECES PURIFICADO
EXTRACTO CRUDO	5	7.2700	36.35	860.47	31278.25	100.00	1.00
POST1 ^{ER} DEAE pH7.5	9	0.1170	1.05	4665.88	4913.29	15.70	5.42
POST 2 ^A DEAE pH8.9	3	0.3054	0.91	13333.33	12215.99	39.05	15.49

6.2.3 ENSAYOS DE INHIBICIÓN CON FÁRMACOS ANTIHELMÍNTICOS:

Además de los ensayos realizados con los dos inhibidores específicos antes mencionados, se probaron fármacos de origen comercial con el objetivo de inhibir a la SOD Cu/Zn de *T. solium*, como el mebendazol, praziquantel, metronidazol, albendazol, tiabendazol, y fenbendazol. Como se observa en la figura 9, los fármacos probados a 100 µM lograron los siguientes porcentajes de inhibición mebendazol 14.06% (DS = 0.935), praziquantel -3.59% (DS = 0.969), metronidazol -2.39% (DS = 0.480), albendazol 41.00% (DS = 0.234), tiabendazol 16.02% (DS = 0.005), y fenbendazol 10.32% (DS = 0.320), en contraste la actividad de la SOD Cu/Zn de *B. taurus* no se vió afectada por ningún fármaco a esta concentración (dato no mostrado). Se observa que con el albendazol se causó el mayor efecto inhibitorio, seguido por el mebendazol y tiabendazol en contraste con el praziquantel, metronidazol, y fenbendazol se observó un efecto opuesto al esperado. Cabe mencionar que como control de inhibición al 100% se hizo un ensayo sin SOD y como control para el 0% de inhibición se utilizó una muestra de SOD con actividad conocida.

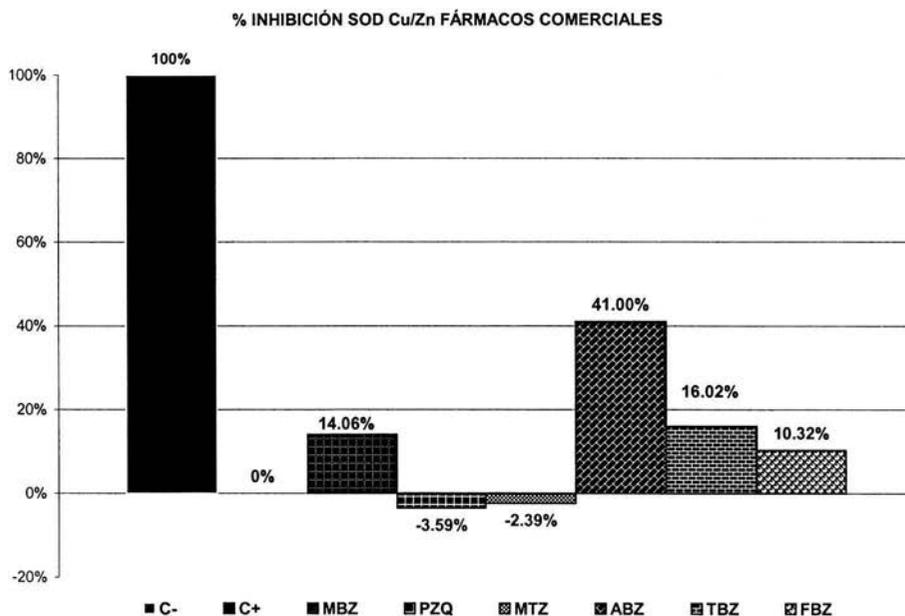


FIG 9 PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE SOD Cu/Zn CON FÁRMACOS. La altura de las barras muestran los porcentajes de inhibición. C-, Control negativo del ensayo, sin SOD, dónde la reducción del citocromo C es total representando el 100% de inhibición. C+, Control positivo el cual se realizó con la Ts SOD Cu/Zn representa una actividad de 100%. MBZ Mebendazol; PZQ Praziquantel; MTZ metronidazol; ABZ Albendazol; TBZ Tiabendazol; FBZ Fenbendazol. Todos los farmacos se ensayaron a 100 μ M.

7. DISCUSIÓN

La superóxido dismutasa (SOD) es una metaloenzima ampliamente distribuida en los organismos que existe en una variedad de formas como las de Cu/Zn, de Mn y la de Fe que protege a los organismos del ión superóxido dismutándolo a H_2O_2 . El $O_2^{\cdot-}$ se forma cuando el O_2 acepta un electrón. Tanto el $O_2^{\cdot-}$ como el H_2O_2 son compuestos que reaccionan poco, sin embargo ambos son tóxicos principalmente por que generan (1O_2), hidroxilo (HO^{\cdot}), y peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) radicales extremadamente tóxicos que destruyen a las células. La *T. solium* como parásito que infecta a sus hospederos mamíferos cerdo y hombre tiene que enfrentarse a estas moléculas tóxicas que se producen en las reacción inflamatoria en contra del mismo (Callahan HL., et al., 1988., Sies H., 1993., Henkle-Dürsen K. & Kampkötter K., 2001).

En este trabajo se logró la producción, purificación y caracterización parcial de una Superóxido dismutasa recombinante de *T. solium* en la bacteria *E. coli*.

El proceso de purificación mediante la cromatografía de intercambio iónico en DEAE fue basado en las características bioquímicas que poseen las proteínas de *E. coli* de unirse al DEAE a pH 7.4 y de no unión a este mismo a pH de 8.9, así como al punto isoelectrico de la SOD Cu/Zn (pI=6.03). Asimismo, la utilización de inhibidores específicos de la actividad para la SOD de Mn (NaN_3) y Cu/Zn (KCN) durante el proceso de la purificación de la enzima recombinante de Cu/Zn producida en la bacteria, ayudo en la purificación. Lo antes mencionado nos permitió excluir las SOD de la bacteria, obteniendo una SOD Cu/Zn con un rendimiento de 2.5% del total de la bacteria a partir de un litro de medio de cultivo en el cual se obtuvo un total de 72.7mg y la enzima con características similares a enzima nativa reportadas para *T. solium* y *T. taeniaeformis* (González R., et al., 2002, Leid & Suquet 1986).

El análisis de los pasos de purificación de la SOD Cu/Zn recombinante mediante geles de poliacrilamida con SDS en condiciones reductoras, mostró que la enzima pura presenta un peso molecular de 16 kDa. Dato que coincide con los tamaños encontrados para otras SOD de Cu/Zn citosólicas de diferentes organismos. Asimismo coincide con el peso molecular real de la enzima determinado por filtración en gel y que presenta una estructura dimérica de alrededor de 30 kDa (Castellanos A., et al., 2002).

Los resultados obtenidos en los ensayos de actividad, utilizando inhibidores como la NaN_3 un inhibidor para las SOD de Mn, que no afecto la actividad de la enzima recombinante y de la inhibición total de la enzima recombinante a una concentración de 10 μM del KCN, un inhibidor específico de las SOD de Cu/Zn, sugiere que esta enzima pertenece al grupo de enzimas que contienen Cu/Zn en su sitio activo.

Un dato interesante fué que además de los inhibidores antes mencionados se probaron fármacos comunmente usados para el tratamiento contra enfermedades causadas por helmintos. El grupo de farmacos ABZ, TBZ, MBZ y FBZ, que pertenecen al grupo de los bencimidazoles tuvieron gran efecto sobre la actividad de la enzima de Cu/Zn de *T. solium*, siendo el ABZ el más efectivo, inhibiendo la actividad de la enzima hasta un 41%, seguido por el tiabendazol mebendazol y fenbendazol, en contraste los fármacos como el prazicuantel y metronidazol no tuvieron efecto sobre la enzima. Cabe mencionar que la enzima de Cu/Zn de *B. taurus* utilizada como control en los ensayos no fué afectada por ninguno de los farmacos antes mencionados. Este dato obtenido es muy ineresante ya que el Albendazol; un bencimidazol constituye un efectivo tratamiento para la neurocisticercosis en humanos y la cisticercosis en cerdos. El mecanismo de acción que el Albendazol realiza para destruir a los helmintos, ha sido previamente descrito y se postula, es debido a que se une a la β -tubulina, inhibiendo la formación de microtubulos. Nosotros, observamos que este farmaco es capaz de inhibir la actividad de la SOD Cu/Zn, lo que sugiere que la acción de estos farmacos puede tener varios blancos en el parásito de ahí su gran efectividad para destruirlos.

Finalmente, el desarrollo de un método para producir una SOD Cu/Zn y la observación de que los becimidazoles son capaces de inhibir a la SOD de Cu/Zn de *T. solium* y no a la de *B. taurus*, abre la posibilidad de realizar estudios para diseñar nuevas moléculas para inhibir a la enzima de *T. solium*, sin alterar las moléculas de sus hospederos.

8. CONCLUSIONES

- 1.- Se describe un método de purificación para la SOD Cu/Zn de *T. solium*.
- 2.- Su peso molecular monomérico es de 16 kDa.
- 3.- Su actividad específica de 13333.33 U/mg.
- 4.- Presenta como cofactor metálico Cu/Zn
- 5.- Los bencimidazoles como el ABZ, TBZ y MBZ inhiben a la enzima.
- 6.- Abre la posibilidad para desarrollar nuevos inhibidores contra helmintos.

9. ANEXO

- Amortiguador salino de fosfatos (PBS 10x)

NaCl	137mM	80.0g
KCl	2.7mM	2.0g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	4.3mM	11.5g

Ajustar a pH 7.4 y aforar a un litro.

- Amortiguador salino de fosfatos pH 7.8

K ₂ HPO ₄	50mM	6.80g
---------------------------------	------	-------

Ajustar a pH 7.8 y aforar a un litro.

- Amortiguador para proteínas

H ₂ O desionizada	3.8 mL
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	1.0mL
SDS 10%	1.6mL
2-mercaptoetanol	0.4mL
Azul de bromofenol	0.4mL

- Amortiguador para electroforesis de proteínas

Tris base	9.0g
Glicina	43.2g
SDS	3.0g

Se afora a 600mL con H₂O desionizada.

- Amortiguador de transferencia

Metanol	20%
Tris	25mM
Glicina	192mM

Se afora a 1L con agua desionizada.

- Gel SDS-PAGE

Acilamida 30%Bis 0.8%
Tris-HCl 1.5M pH 8.8
Tris-HCl 1.5M pH 6.8
SDS 10%
Temed (N,N,N',N'-Tetrametil etil diamino)
Persulfato

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Medio de cultivo Luria Betani (LB)

NaCl	5.8g
MgSO ₄ 7H ₂ O	2.0g
Tris-HCl 1M pH 7.5	50.0mL
Gelatina al 2%	5.0mL

Todos los componentes del medio de cultivo se diluyen y aforan a 1L con agua desionizada. El pH del medio se ajusta a 7.0 y se esteriliza en autoclave durante 20min a 15Lb de presión en ciclo líquido.

- Disolución A de Lowry

Na ₂ CO ₃	10g
NaOH	2g
Tartrato de Na y K	0.1g

Aforar a 500 mL.

- Disolución B de Lowry

CuSO ₄ 5H ₂ O	0.5g
-------------------------------------	------

Aforar a 1L

- Disolución C de Lowry

50 partes de disolución A + 1 parte de B (preparar al momento de usar)

- PBS 1X-TWEEN 0.3%

PBS 1X	100mL
TWEEN	300µL

Aforar a 100mL y preparar al momento de usarse

- Leche 5%

Leche	2.5g
PBS-TWEEN	50mL

- Solución reveladora

Diaminobencidina	1.01g
H ₂ O ₂	5µL
PBS 1X	50mL

- Tris-HCl 50mM pH 7.5 y 8.9

Tris	6.05g
------	-------

Ajustar al pH correspondiente y aforar a 1L

- Tris-HCl 50mM pH 7.5 y 8.9 con 1M NaCl

NaCl	54.5g
------	-------

Aforar a 1L con amortiguador tris al pH correspondiente.

10. REFERENCIAS

- Allan JC, Avila G, Garcia Noval J, Flisser A, Craig PS. Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. *Parasitology*. 1990.
- Barry M, Kaldjian LC. Neurocysticercosis. *Sem Neurol* 1993.
- Botero D. Estudio sobre cisticercosis en Colombia. *Rev UIS Medicina Bucaramanga Colombia*. 1986.
- Brophy P. & Pritchard D., immunity to helminths: ready to tip the biochemical balance? *Parasitol today*. 1988.
- Callahan HL, Crouch RK., James E.R. Helminth anti-oxidant enzymes: A protective mechanism against host oxidants? *Parasitol Today* 1988.
- Carpio A. Neurocysticercosis: an update. *Lancet Infect Dis*. 2002.
- Castellanos Gonzáles A., Jiménez L., Landa A., Cloning, production and characterisation of a recombinant Cu/Zn superoxide dismutase from *Taenia solium*. *International Journal for Parasitology* 2002.
- Chapman A, Vallejo V, Mossie KG, Ortiz D, Agabian N, Flisser A. Isolation and characterization of species-specific DNA probes from *Taenia solium* and *Taenia saginata* and their use in an egg detection assay. *J Clin Microbiol*. 1995.
- Correa MD, Flisser-Steinbruch A, Sarti-Gutiérrez E, Valdespino-Gómez JL, Del Rio-Zolezzi A, Velasco-Castrejón D, Escobar A, Ibáñez-Bernal S, Magos-López E, Teniasis y cisticercosis. ed. *Enfermedades Tropicales en México*. México, D.F.: Secretaría de Salud, 1994.
- Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Chang LY. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992.
- Cross A. & Jones O. Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta* 1991.
- Cruz M, Cruz I, Horton J. Albendazole vs praziquantel in the treatment of cerebral cysticercosis: clinical evaluation. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1991.
- DeGhetaldi LD, Norman RM, Douville AW jr. Cerebral cysticercosis treated biphasically with dexamethasone and praziquantel. *Ann Intern Med* 1983.
- Del Brutto OH. CT findings in neurologically normal adults with a single generalized seizure. *J Epilepsy* 1994.
- Del Brutto OH. Cysticercosis and cerebrovascular disease: a review. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 1992.
- Del Brutto OH. Cysticercosis. In: Feldmann E, ed. *Current diagnosis in neurology*. St. Louis: Mosby, 1994.
- Del Brutto OH. The use of albendazole in patients with single lesions enhanced on contrast CT. *N Engl J Med* 1993.
- Díaz F., Cerebral cysticercosis in Poland: clinical symptoms and operative results in 132 cases. *J Neurosurg* 1962.
- Díaz F., García HH, Gilman RH, *et al*. Epidemiology of taeniasis and cysticercosis in a Peruvian village. *Am J epidemiol* 1992.
- Díaz S., Candil R, Uribe M, Willms K. Serology as an indicator of *Taenia solium* tapeworm infections in a rural community in Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990.

- Flisser A, Correa D, Plancarte A, Sandoval MA, Avila G, Vallejo V. New approaches for the diagnosis of *Taenia solium* taeniosis/cysticercosis. *Ann Parasitol Hum Comp* 1990.
- Flisser A, Madrazo I, Plancarte A, Schantz P, Allan J, Craig P *et al.* Neurological symptoms in occult neurocysticercosis after a single taenicial dose of praziquantel. *Lancet* 1994.
- Flisser A, Sarti E, Lightowers M, Schantz P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Trop.* 2003.
- Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Rev Biochem* 1995.
- García HH, Gilman R, Martínez M, *et al.* Cysticercosis as a major cause of epilepsy in Peru. *Lancet* 1993.
- García-Albea E. Cisticercosis en España. Algunos datos epidemiológicos. *Rev Clin Esp* 1989.
- Getzoff ED, Tainer JA, Stempien MM, Bell GI, Hallewell RA. Evolution of CuZn superoxide dismutase and the Greek key beta-barrel structural motif. *Proteins*. 1989.
- González R., Mendoza-Hernández G., Plancarte A., Purification of *Taenia solium* cysticerci superoxide dismutase and myoglobin copurification. *Parasitol Res.* 2002.
- Goodman & Gilman The pharmacological basis of therapeutics. 10th Edition Hardman JG, Limbird LE, Goodman Gilman A (Eds) McGraw-Hill, New York, USA. 2001.
- Hemut S., Strategies of antioxidant defense., FEBS., 1993.
- Henkle KJ, Liebau E, Muller S, Bergmann B, Walter RD. Characterization and molecular cloning of a Cu/Zn superoxide dismutase from the human parasite *Onchocerca volvulus*. *Infect Immun.* 1991.
- Henkle-Dürsen K., Wamecke C., Brattig N., Liebau E. and Walter R.D., Characterization of enzymatically active *Onchocerca volvulus* Cu/Zn superoxide dismutase expressed in *Escherichia coli*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1994.
- Henkle-Dürsen K. & Kampkötter K., Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes., *Molecular & Biochemical Parasitology.* 2001.
- James E.R. Superoxide Dismutase. *Parasitology Today.* 1994.
- Jung H, Hurtado M, Medina MT, Sanchez M, Sotelo J. Dexamethasone increases plasma levels of albendazole. *J Neurol* 1990.
- Khan N. & Sotelo J. Presentation of a membrane cysticercus antigen and its homology with excretory-secretory antigen. *Acta Leidensia* 1989.
- Kramer J, Carrazana E, Cosgrove GR, Kleeffeld J, Edelman RR. Transaque ductal migration of a neurocysticercus cyst. *J Neurosurg* 1992.
- Lamothe AR. & García PI., *Helmintiasis de hombre en México* Edit., AGT editor s.a., México., 1988.
- Lattemann, C.T. Yan Z.X., Matzen A., Meyer T.F. and Apfe H. I, Immunogenicity of the extracellular copper/zinc superoxide dismutase of the filarial parasite *Acanthocheilonema viteae* delivered by a two-phase vaccine strain of *Salmonella typhimurium*. *Parasite Immunol.* 21 1999.

- Leonard JM. Cerebrospinal fluid formula in patients with CNS infections. *Neurol Clinics North Am* 1986.
- Liddell S. & Knox D., Extracellular and cytoplasmic Cu/Zn superoxide dismutases from *Haemonchus contortus*. *Parasitology*. 1998.
- Manoutcharian K, Rosas G, Hernández M, Fragoso G, Aluja A, Villalobos N *et al*. Cysticercosis: Identification and cloning of protective recombinant antigens. *J Parasitol* 1996.
- Marcial-Rojas RA ed. Pathology of protozoal and helminthic diseases with clinical correlation. Baltimore: Williams & Wilkins, 1977.
- Mc Cord J.M., Fridovich I. Superoxide Dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1969.
- McGonigle S, Curley GP, Dalton JP. Peroxiredoxins: a new antioxidant family. *Parasitol today*. 1998.
- Molinari JL, Meza R, Suárez B, Palacios S, Tato P, Retana A. *Taenia solium*: Immunity in hogs to the cysticercus. *Exp Parasitol* 1983.
- Molinari JL, Soto R, Tato P, Rodríguez D, Retana A, Sepúlveda J *et al*. Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: A field and laboratory study. *Am J Trop Med Hyg* 1993.
- Monteiro L, Coelho T, Stocker A. Neurocysticercosis - A review of 231 cases. *Infection* 1992.
- Neal JH. An endoscopic approach to cysticercosis cysts of the posterior third ventricle. *Neurosurgery* 1995.
- Organización Mundial de la Salud., Control de la cisticercosis. A55/23. 2002
- Pal Deb K., Carpio A., Sander W. Neurocysticercosis and epilepsy in developing countries. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*., 2000.
- Richards F. Jr. & Schantz P. Laboratory diagnosis of cysticercosis. *Clin Lab Med* 1991.
- Sánchez Moreno M., García-Ruiz M.A., García-Rejón L., Valero a., Leon P., Superoxide Dismutase in Cestodes. *Drug Res*. 1989.
- Sarti E, Schantz P, Plancarte A, Wilson M, Gutiérrez I, Aguilera J *et al*. Epidemiological investigation of *Taenia solium* teniosis and cysticercosis in a rural village of Michoacan State, Mexico. *R Soc Trop Med Hyg* 1994.
- Sarti E, Schantz P, Plancarte A, Wilson M, Gutiérrez I, López A *et al*. Prevalence and risk factors for *Taenia solium* teniosis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 1992.
- Sarti E. La taeniasis y cisticercosis en México (revisión bibliográfica). *Salud Publica Mex* 1986.
- Schantz P, Cruz M, Sarti E, Pawlowski Z. Potencial erradicability of teniosis and cysticercosis. *Bull Panam Health Organ* 1993.
- Schmidt G.D., Roberts L.S. Cestoidea: Form, function, and classification of the tapeworms: Foundations of parasitology. Idem, 6ª, McGraw Hill, USA, 2000.
- Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993.
- Southorn P. & Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988.

- Tang L., Ou X., Henkle-Dührsen K. and Selkirk M.E., Extracellular and cytoplasmic CuZn superoxide dismutases from *Brugia* lymphatic filarial nematode parasites. *Infect. Immun.* 1994.
- Tay-Zavala J., Lara-Aguilera R. *Parasitologia Medica.* 1995.
- Toledo A, Fragoso G, Rosas G, Hernandez M, Gevorkian G, Lopez-Casillas F, Hernandez B, Acero G, Huerta M, Larralde C, Sciutto E. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infect Immun.* 2001.
- Tracy J. & Vande E. *Xenobiotic Metabolism: Biochemistry and Molecular Biology of Parasites.* Marr J., Muller M., Academic Press, San Diego, 1995.
- Vianna LG, Macedo V, Mello P, Costa JM, Yoo JM. Estudo clinico e laboratorial da neurocisticercose em Brasilia. *Rev Bras Neurol* 1990.
- Vibanco-Perez N, Jimenez L, Merchant MT, Landa A. Characterization of glutathione S-transferase of *Taenia solium*. *J Parasitol.* 1999.
- Willms K. & Sotelo J. *Cestodes. Principles and practice of parasitology.* Jhon Wiley and Sons Ltd. 2001.
- Zini D, Farrell VJR, Wadee AA. The relationship of antibody levels to the clinical spectrum of human neurocysticercosis. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 1990.